

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

健康食品に関する有害事象の聞き取り票（追加様式1）

該当箇所には○印または空欄に記入してください。従来の「受付票」にもある項目で、重複するときはこの票に記入する必要はありません。この票は必要な情報項目を示したもので詳しい情報の収集を制限するものではありません。

ID		聞き取り日 2013年 月 日				
報告者（該当に○）		本人	家族	医療関係者	その他（ ）	
**** 以下は有害事象を受けた人に関する情報 ****						
1	性別（該当に○）	男	女	不詳		
2	年齢	歳代			不詳	
3	居住地	郵便番号、住所、固定電話の市外局番のいずれか			不詳	
4	製品名					
5	症状 （該当に○ または記入）	発疹・発赤・掻痒 吐き気・嘔吐 胃痛・腹痛 下痢 便秘 肝機能障害（肝機能検査値の上昇） 腎機能障害（むくみ、尿タンパクの出現） 呼吸器障害（息切れ、呼吸困難） 循環器障害（血圧上昇、動悸・頻脈） 神経障害（頭痛、めまい） 血液障害（貧血症状、出血症状） その他（ ）				
6	症状の発生時期	年	月	日	不詳	
7	医療機関受診 （該当に○または 記入）	無 有（医学的検査： 無 有）			不詳	
8	転帰（該当に○）	自然治癒	外来で治療	入院	後遺症	死亡
9	製品の摂取状況 （該当箇所）に記入） （該当に○）	期間 年 月 日 から 年 月 日 まで				不詳
		摂取量 錠・カプセル・包（粉末）				不詳
		摂取頻度 回 日 / 週				不詳
		減量・中止の有無： 無 有 （減量・中止後の症状： 改善 変化なし 不詳）			不詳	
		再摂取の有無： 無 有			不詳	
10	他の健康食品・医薬品の併用状況 （該当に○または記入）	健康食品	無 有（製品名： ）			不詳
		医薬品	無 有（製品名： ）			
11	基礎疾患・体質 （該当に○または記入）	基礎疾患：	無 有 （疾患名： ）			不詳
		アレルギー体質：	無 有 （食物・医薬品・花粉・ハウスダスト）			
相談者からの返品要求（参考情報）（該当に○）		無 有			不詳	

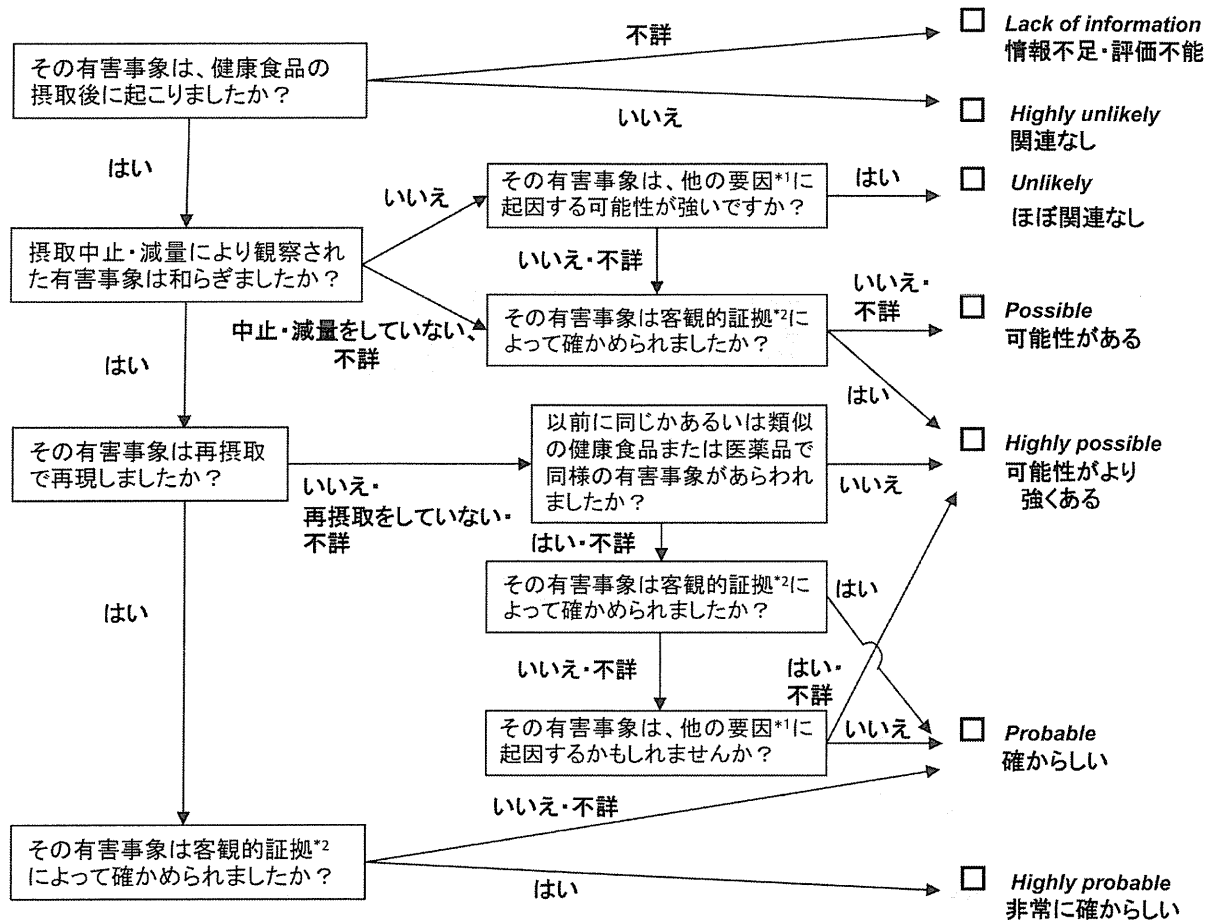
図1 有害事象の聞き取り票

因果関係評価票 (I と II の両方を評価)

追加様式2

<Shizuoka Adverse Reaction Causality Assessment Tool for Health Food>¹⁾

I: ここから開始して評価してください。
(□のチェックボックスにシ点をに入れてください。)



*1 他の要因としては、基礎疾患や合併症の病態、併用薬やほかの健康食品の摂取、年齢などを考慮します。
*2 客観的証拠とは、当該健康食品に含まれる成分に関してDLST、パッチテストなどの特異的な検査によって確認されたものです。

II: 健康被害の重篤度²⁾をチェックしてください。

- 軽微な健康被害と考えられるもの
- 軽度な健康被害と考えられるもの (例: 医療機関で治療を要した。)
- 中等度の健康被害と考えられるもの (重篤ではないが軽度でもない。)
(例: 30日以上の治療、または入院・入院の延長を要するものなど)
- (死亡・後遺症を残すなど)重篤な健康被害と考えられるもの

参考文献: 1) 山田 浩ほか, 臨床薬理. 2012; 43(6):399-402.
2) 副作用の重篤度分類基準, 厚生労働省課長通知 平成4年6月29日薬安第80号

図2 因果関係評価票

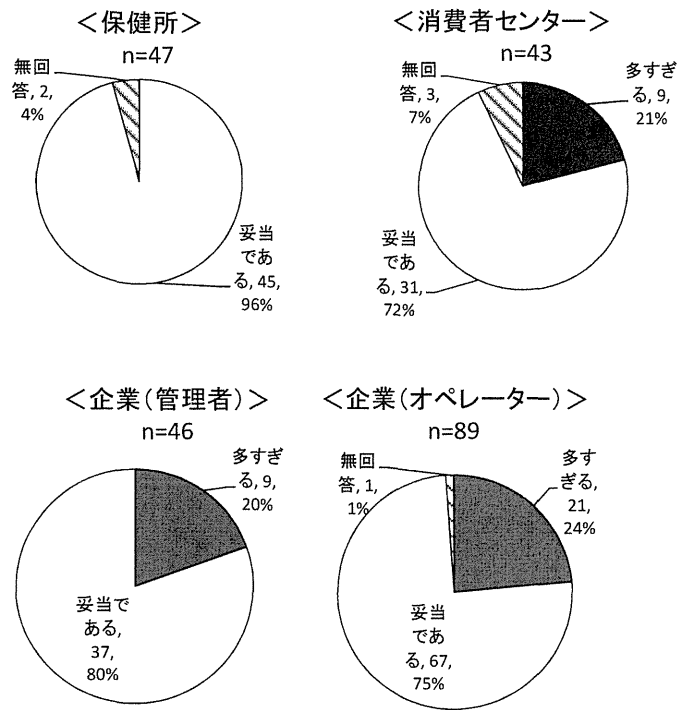


図3 聞き取り票の聞き取り項目数と内容について

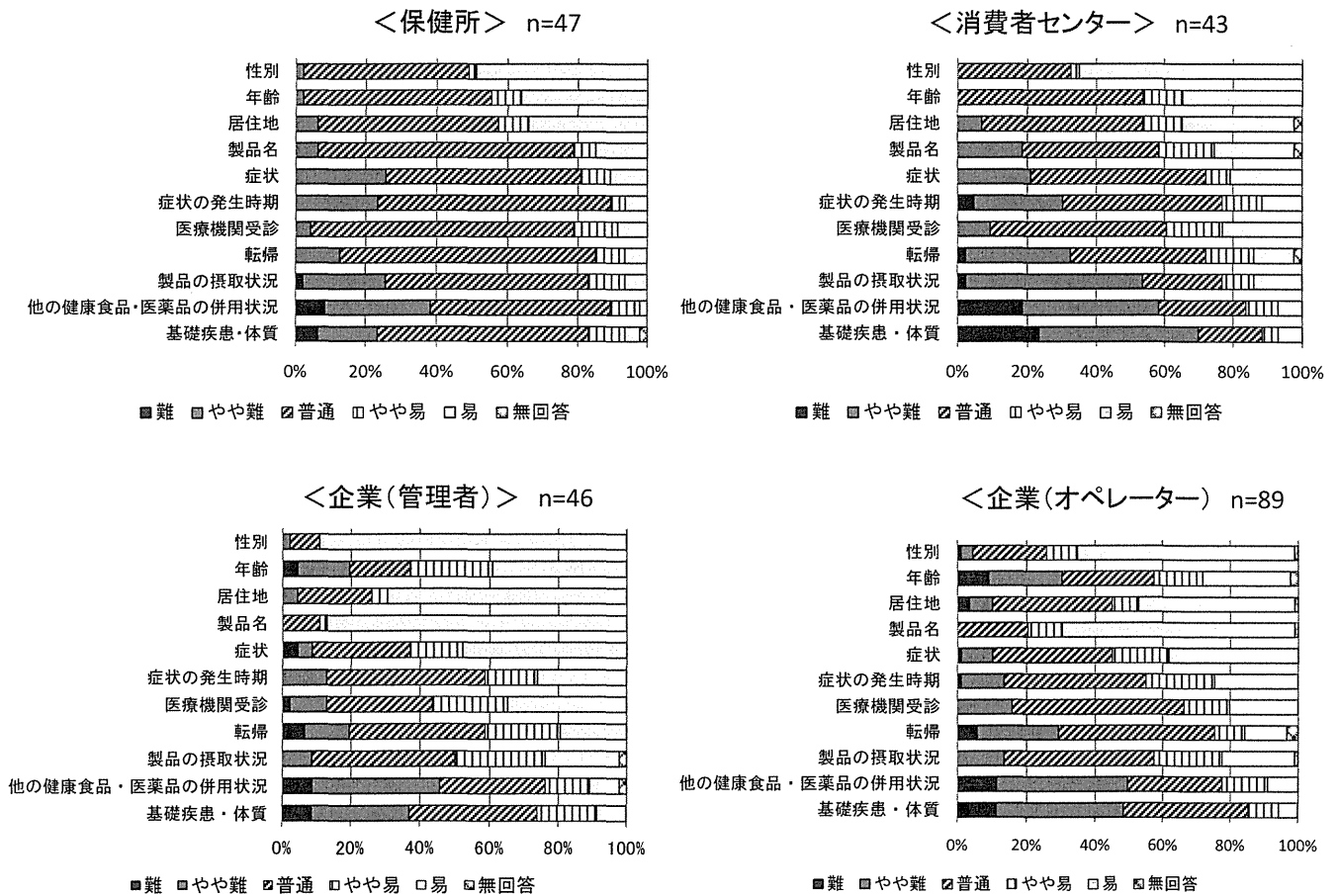


図4 現状と比較したときの、書く聞き取り盲目に関する聞き取りの難易度について

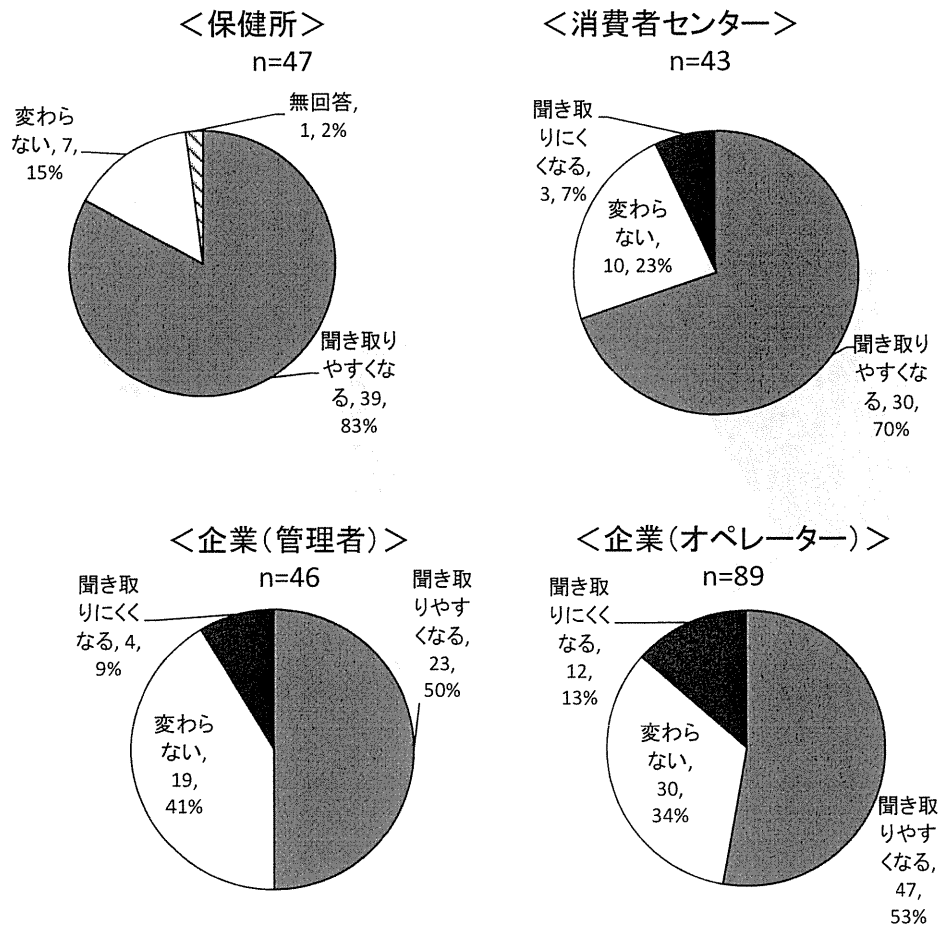


図5 聞き取り票を使用したときの聞き取り作業への影響について

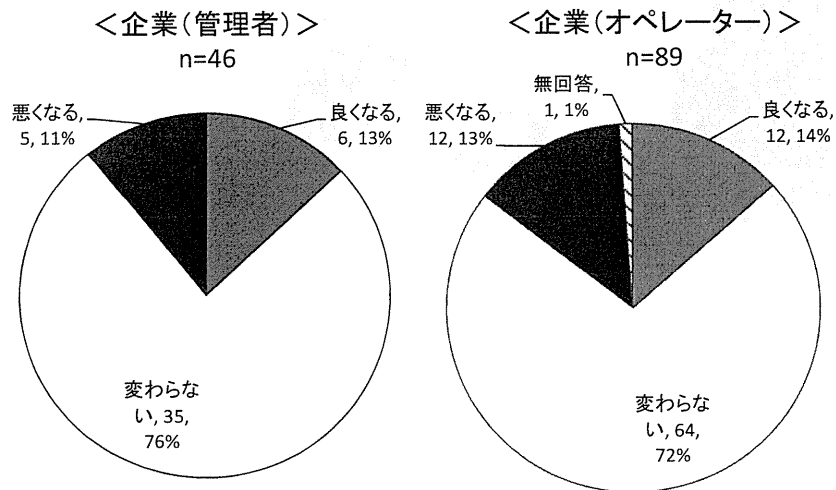


図6 聞き取り票を使用したときの顧客との関係（企業関係者への質問）

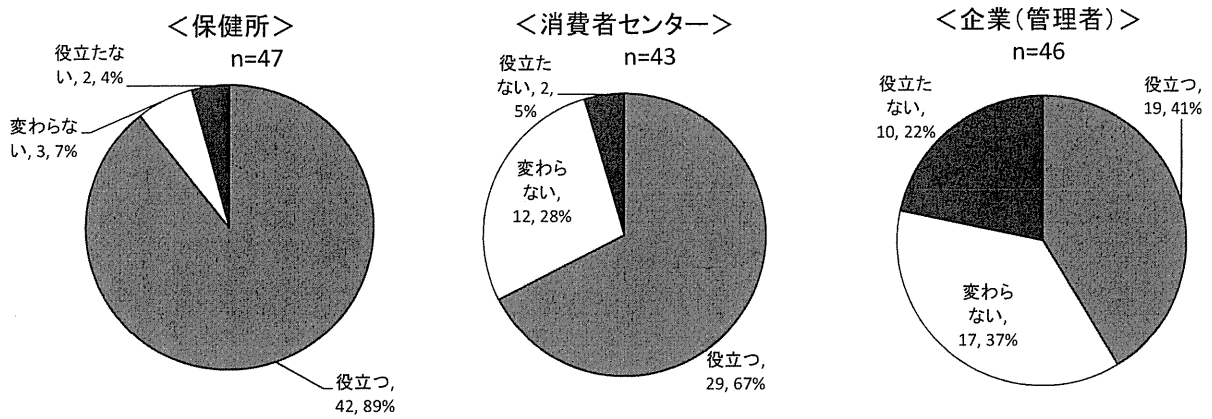


図7 「因果関係評価票」の消費者への対応について

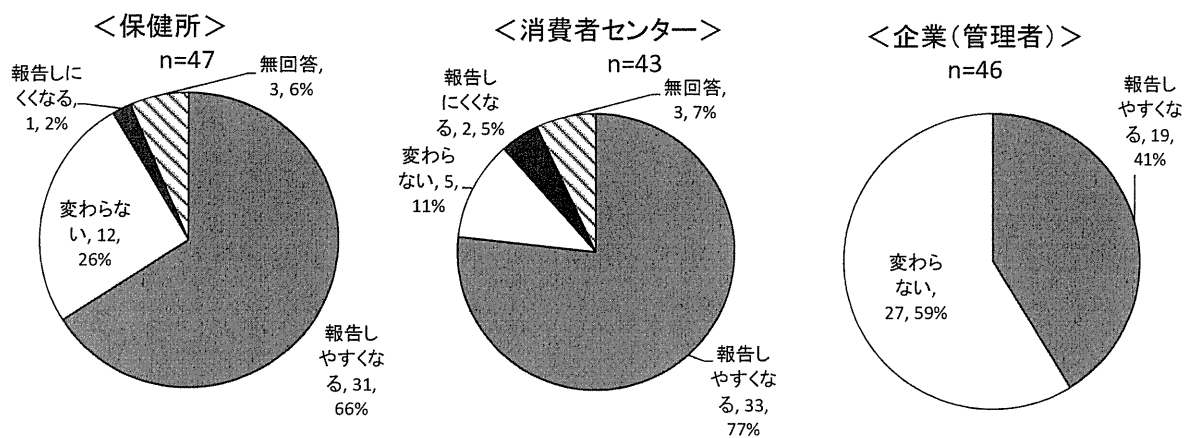


図8 「因果関係評価票」の扱いと報告のしやすさ

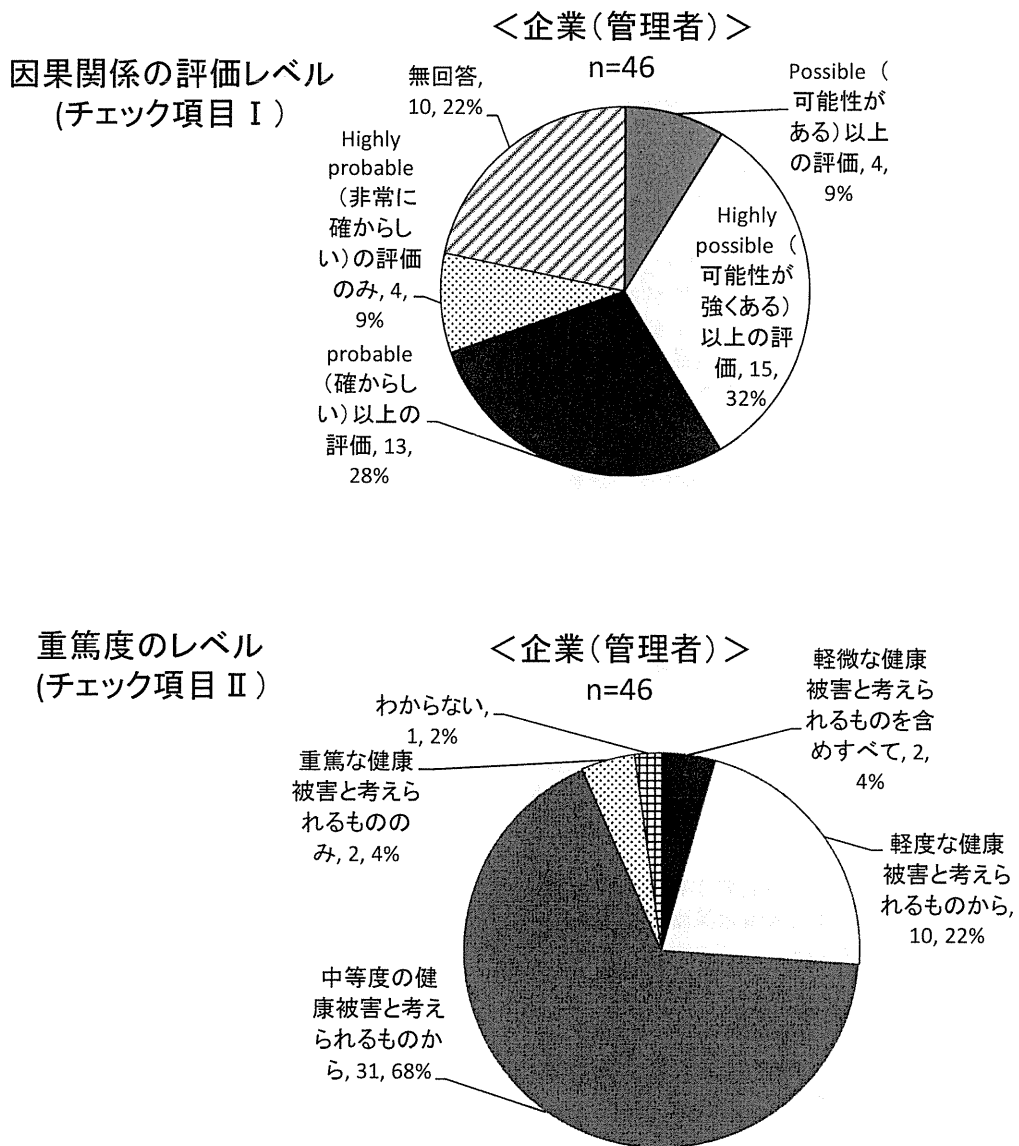


図9 有害事象の報告が義務付けられた場合に、妥当と思われる「因果関係評価票」中の報告レベル

<保健所>

- ・因果関係評価票はとともわかりやすい。
- ・聞き取り票があれば聞きもらしがないので良い。
- ・有害事象が寄せられたことはないが、通報を受けた際は因果関係評価票が役に立つと思う。
- ・因果関係評価票で、医師の所見が必要かと思われる項目（他の要因に起因する可能性、健康被害の重症度など）については、届出者及び監視員が記入するのは難しい。
- ・聞き取り項目に「製品のロット」もあるとよい。
- ・食品の情報については、従来の受付票と同様に賞味期限、製造者（販売者）等の詳細な情報が記入できると情報が集約されてよい。
- ・因果関係評価票で、医師の診断名や所見についても記入できると、症状との因果関係の程度がわかる。
- ・因果関係評価票で、専門用語が多い為、わかりにくい部分がある。
- ・「健康被害受付処理票」と「聞き取り票」が一枚にまとまっていると聞き取りやすい。

<消費者センター>

- ・現在、消費者安全法に基づき重大事故等を消費者庁へ通報しているが、相互性が保たれた「聞き取り票」や「因果関係評価票」になっている方が記入しやすい。
- ・聞き取り作業という点では作業量が多いわけではなく問題ない。ただし、消費生活相談員が因果関係評価票の中で、他の要因に起因するかといった質問を判断できるか疑問（消費生活相談は消費者の申し出内容をもとにすることや相談員によって健康食品に対する知識に差がある）。
- ・消費生活相談は受け付ける内容が多岐に渡っている。健康食品の相談を特別に追加聴取する必要があるという印象を相談員に与え、負担を感じさせてしまう可能性がある。
- ・現状業務の範囲で、機械的に国立健康・栄養研究所、都道府県担当部署、厚生労働省、厚生局、消費者庁等に情報提供できる仕組みができればよい（例：健康食品に関する有害事象と思われる項目が選択された時点で各地方厚生局を案内するよう画面上にアラートとして表示させるなど）。
- ・相談を受ける際に聞き取る内容とリンクしている部分が多く、この聞き取り票があれば更に聞き取りやすくなると思うが、実際高齢者からの相談も多く、商品名、メーカー名など不明のケースも多い。
- ・相談者にとって「因果関係評価票」の質問項目の言葉は難しく、身近な言葉で質問した方がいいと思う。（相談者に対する説明が必要だが、健康食品に特化した聞き取り部署を作成し、その担当者にアドバイザースタッフなどを配置する対応が現実的）。
- ・高齢者（認知症）の相談者の場合、チェック項目（持病・要介護）があるとよい（情報収集票の改善点）。
- ・有害事象について商品・サービスごとに設けては受付件数の少ない相談窓口の場合聞き取りに習熟することが難しい。健康食品に限らず相談者が「危害を受けた」という相談は少ないので、健康食品に関する有害事象と思われる項目が選択された時点で各地方厚生局を案内するよう画面上にアラートとして表示させるのがよいのではないかと。
- ・共通の項目での入力に大賛成。PIO-NETでいかに入力しやすくするかが課題。宝の中を使いやすくするためにはシステムの構築も大切。
- ・相談者それぞれ個性があるため、非常に協力的な方と非協力的な方に分かれる（消費者側への協力対応依頼）。
- ・相談者それぞれ個性があるため、非常に協力的な方と非協力的な方に分かれる。

<企業>

- ・聞き取り票の「症状の発生時期」は特定が難しい。飲用後何日目かという聞き方の方が聞きやすい。
- ・年齢、併用薬、基礎疾患などは個人情報保護の観点やお客様へ過度の期待（治療に対する）を持たせてしまう恐れがあり、必要以上の聞き取りは難しい。
- ・オペレーターは医療従事者ではないので、症状に関する聞き取り情報の信頼性は低く、問題が生じる可能性がある。
- ・因果関係評価票は全て消費者の申し出ベースで評価するのか、サプリメントの会社としての評価も入るのかを明確にしていた方がよい。
- ・「軽症でも因果関係が強いもの」まで行政の報告が義務化されると件数の多さが目立つ企業は困る。
- ・より専門性のある医師、薬剤師などであればいいが、内容を正しく理解できるか、一般のオペレーターでは無理な部分も多い。

図 10 実施したアンケートの自由記述による意見

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

製品の品質と原材料の安全性に関する研究
薬物代謝酵素 cytochrome P450 への影響を指標とするハーブ製品の安全性評価

研究分担者 志村二三夫 十文字学園女子大学
研究協力者 山崎 優子 十文字学園女子大学
佐々木菜穂 十文字学園女子大学
端田 寛子 昭和学院短期大学

研究要旨

ハーブ素材を利用した健康食品には、植物の多様性を反映した幅広い植物種の中から、従来の食経験が乏しい素材や、食経験が豊富であっても、特定成分を抽出・濃縮するなどして、錠剤やカプセル剤等の形状で利用するものが多い。しかしながら、このような健康食品の安全性評価手法は定まっていない。そこで、片頭痛の予防に有効であると推奨されている一方、肝障害への注意喚起がなされているバターバーを対象に、その dietary supplement 製品について、食品添加物の安全性評価手法を参考に、脂溶性生体異物の標的・処器官である肝臓の薬物代謝酵素 cytochrome P450 への影響を指標として検討した。その結果、ヒトの一日摂取目安量の 100 倍量の BB 製品のラットへの投与は、肝臓における CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1 の遺伝子発現を強く亢進させるとともに、肝臓肥大を引き起こすことが明らかとなった。NOAEL から ADI を算定する際の不確実係数を考慮すると、ラットで認められたような BB の影響がヒトでも生じる可能性を否定することはできず、医薬品との相互作用への懸念も生じる。このような医薬品との相互作用が、BB 摂取にともなう肝障害発生の機序の一端をなしていることも想定できる。一方、BB 投与ラットでは腎臓尿細管上皮内の硝子滴沈着を生じたが、これは人への外挿の際には問題にならない雄ラットに特有な $\alpha 2 \mu$ -グロブリンによるものと推定された。以上より、食品添加物の安全性評価法を参考に、CYP の発現誘導を主な評価指標として得られた本研究の知見は、ハーブ素材の安全性評価手法の確立に資すると考える。

A. 研究目的

健康食品の素材は多彩であるが、植物とその二次代謝産物の多様性を反映して、ハーブを利用するものが多く、とくにいわゆる健康食品に多い。二次代謝とは、多くの生物分類群に共通な一次代謝、すなわちエネルギー代謝、アミノ酸・タンパク質・核酸の合成等とは別に、限られた生物群に特徴的な代謝である。植物の二次代謝産物には、紫外線遮蔽物質や抗酸化物質、微生物や病虫からの防御物質、動物に対する有害物質等のように、適応戦略上の武器と推測できるものが少なく

ない。

ハーブは日本では一般に、薬草、香辛料とする草、天然物なので安全と理解されているが、これは一面的な捉え方である。生物学分野では、ハーブの語は価値（有効性や安全性等）とは無縁で、単に木本 (arbor) に対する草本 (herb) を意味する。さらに、ハーブの専門事典では、草本の括りを超えて木本から菌類に至るまでハーブの範囲が拡張され、医療や健康の維持・増進、病虫害駆除、その他多岐にわたる経済・産業面での有用性をもつ植物、また抽出物等として、実用的見

地でハーブが定義されているが、本報告でも同様とする。

健康食品は素材のみならず形状も多彩であり、見ただけで食品と判別できる明らか食品と呼ばれるものから、カプセルや錠剤等のかつては医薬品的とみなされた形状のものもある。

日本では、平成10年の「医薬品の範囲に関する基準」の改正を契機に、様々なハーブ素材が医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質（原材料）リストに例示されるようになった。

ハーブ素材には、植物の多様性を反映した幅広い植物種の中から、従来 of 食経験が乏しかった素材を利用するものや、食経験が豊富な素材であっても、その特定成分を抽出・濃縮するなどして、錠剤やカプセル剤等の形状で利用するものが多い。

錠剤やカプセル剤等の形状のハーブ製品は、明らか食品とは異なり、有効成分だけでなく有害成分も濃縮されている可能性がある。しかし、利用者は医薬品ではなく健康食品ということで、安全なものと思われやすく、その形状も相俟って、過剰かつ長期摂取につながり易いので、安全・安心な利用の面でとくに配慮を要する。

実際、ハーブ製品の摂取に伴う有害作用の事例は多く、とくに脂溶性生体異物の処理部位である肝臓を標的として生じた健康被害の原因と推定されるハーブ素材が少なくない。

2012年2月に厚生労働省は事業者にバターバー（西洋フキ、Butterbur、学名；*Petasites hybridus*）製品の自主回収の依頼、消費者に使用禁止の注意喚起を行った。バターバーは、キク科フキ属の多年草で、ヨーロッパ全域、アジアや北アメリカに分布する。

その有効性や安全性に関して、国立健康・栄養研究所の「健康食品」の素材情報データベースでは次のように記載されている。“俗に「鼻づまり、花粉症によい」「片頭痛によい」「尿管の炎症によい」な

どといわれている。ヒトでの有効性については、ドイツのコミッションEモノグラフ（薬用植物評価委員会）が尿路の急性の痙れん痛に対する使用を承認している。また、特定の製剤では片頭痛に対する有効性が示唆されている。安全性については、ピロリジジナルカロイドを含有する製品はおそらく危険と思われる。また、ピロリジジナルカロイドを除去した製品でも肝障害が報告されたためヨーロッパ諸国ではバターバー製品は承認されていないか、制限されている。欧州評議会のカテゴリーでは「食品では使用されない」とされている。妊娠中・授乳中の摂取は避けたほうがよい。”

一方、the American Academy of Neurology and the American Headache Societyの品質基準賞委員会が最近報告したシスマティックレビューでは、バターバーは片頭痛の予防に有効であり、片頭痛発作の頻度および重篤度を低下させるために患者に推奨すべきであるとし、有効性を高水準のレベルAと評価している。さらに、Canadian Headache Society Prophylactic Guidelines Development Groupは、片頭痛に対して、11種の予防薬等の利用を強く推奨しているが、バターバーもその1つに上げられている。

バターバーの食薬区分に関しては、日本では「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）」にも「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質（原材料）」にも該当しない。欧州評議会（Council of Europe）のカテゴリーでは「食品では使用されない」（not used in food）とされている。しかし、米国ではソフトゲル等の形状のバターバー製品が新型食品の一つのジャンルであるdietary supplementとして販売されている。したがって、バターバー製品はインターネット取引によって日本国内でも入手できる可能性がある。ただし、その安全性評価のために行われた試験研究ほとんど見当たらない。

一方、著者らは、重篤な肝障害を多発させたカバ（*Piper methysticum*）製品に

ついて、食品添加物のリスク評価の考え方を参考とし、また環境化学物質への経口曝露の鋭敏な指標とされる肝臓における CYP1A の遺伝子発現への影響を評価指標として検討した。その結果、製品の一日摂取目安量は、食品添加物等について設定されている許容一日摂取量 (ADI) を超過している可能性が示された。

食品添加物のリスク評価では、動物試験で得られた無毒性量 (NOAEL) を不確実係数 (通常は 100) で割ることによって、ヒトが一生にわたり毎日摂取しても健康上悪影響がないと推定される最大摂取量である ADI が重量/体重 kg/日として設定されている。不確実係数 100 は、動物試験における NOAEL をヒトへと外挿して ADI を設定する際に、経験的に種の違いによる毒性の差 (種差) は 10 倍を超えず、また個体の違いによる毒性の差も 10 倍を超えないということで、両者を乗算して設定された値である。

そこで、本研究では、ハーブ製品の安全性評価手法を確立するための一環として、バターバー製品をモデルに、その一日摂取目安量の 100 倍量 (体重 kg 当たり) をラットに投与する試験において、有害事象の有無を検討し、一日摂取目安量が ADI に相当する量であるかどうかを検討した。

B. 研究方法

(1) 試薬等

動物実験に用いたバターバー抽出物製品 (A および B) は、メーカーによる規格抽出物を利用した市販製品であり、インターネット通販により iHerb (<http://www.iherb.com/index.html>) から購入した。1 日摂取目安量 100mg 中に、15mg のペタシンを含むように標準化され、ピロリジジナルカロイドを除去したとされている。CYP 酵素活性の測定には、蛍光源基質として、7-ethoxyresorufin (ER)、methoxyresorufin (MR)、pentoxyresorufin (PR)、benzyloxyresorufin (BR)、dibenzylfluorescein (DBF) を用いた。

(2) 動物実験

①実験 1

体重約 200 g の SD 系雄ラットを(株)埼玉実験動物供給所より入手し、飲用水、AIN93G 飼料 (オリエンタル酵母製) を自由に摂取させた。

バターバー抽出物は、製品の内容物をソフトゲルより取り出してプールし、サフィード・フィーディングチューブ Fr. 5 (テルモ) を用いて、体重 1 kg あたり 0.145mL/100 g BW の割合で胃内に投与した。バターバー抽出物のラットへの投与量は、ヒトの体重を 60 kg と仮定し、各ラットに対して体重当たりでヒト一日摂取目安量の上限値の所定の 10 倍量 (BB (10) 群) および 100 倍量 (BB (100) 群) となるように設定し、1 日 1 回 (11-13 時)、8 日間、胃内に反復投与した。

飼育最終日の前日より絶食 (~18 時間) させたラットを熟練者が物理的に安楽死させ、血液を採取した後、肝臓等を速やかに摘出し、質重量を測定した。組織病理検査用の試料は、10%ホルマリン中で固定させた。total RNA 調製用の試料は、RNAlater RNA Stabilization Reagent 中に保存した。

②実験 2

実験 1 に準じ、バターバー製品 (A または B) より取り出した抽出物を体重約 200 g の SD 系雄ラットに対して体重当たりでヒト一日摂取目安量の上限値の所定の 100 倍量 (BB (100)) 投与して実施した。

③実験 3

実験 1 に準じ、体重約 180 g の SD 系雌ラットあるいは体重約 200 g の SD 系雄ラットに対して体重当たりでヒト一日摂取目安量の上限値の所定の 100 倍量 (BB (100)) 投与して実施した。

(3) 肝臓・腎臓の病理組織学的検査

ホルマリン固定した肝臓および腎臓試料について、(株)札幌病理研究所に HE 染色組織標本の作成および病理組織学的検査を委託した。

(4) 肝臓ミクロソーム画分の調製

新鮮肝臓組織 1 g より常法にて調製し 0.5 mL の 50 mM Tris-HCl/1 mM EDTA/1 mM DTT/20 % (v/v) glycerol、pH 7.4 に懸濁させてミクロソーム画分とし、使用時まで -80°C に保存した。

(5) CYP 分子種の酵素活性の測定

CYP 分子種の酵素活性は、resorufin 誘導体の蛍光原基質 alkoxyresorufin 等を用いる Kennedy らの方法、あるいは蛍光原基質 dibenzylfluorescein を用いた Stresser らの方法に準じて測定した。ただし、それぞれの原法がエンドポイントアッセイであるのに対して、本研究では Mx3000P リアルタイム PCR 装置を蛍光マイクロプレートリーダーとして利用し、反応産物の増加に伴う蛍光強度の増加を経時的にモニターするレートアッセイ法に改良して測定した。

(6) Western blot 法による CYP 分子種のタンパク質発現の検討

各群ラットの肝臓より調製したミクロソーム画分について、10%アクリルアミドゲルを用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。次いで、分離されたタンパク質をゲルからイモビロントランスファーメンブレンにエレクトロトランスブロッティングにより転移・吸着させて免疫染色を行った。

(7) Real-time RT-PCR 法による CYP 分子種の mRNA 発現量の解析

Total RNA は、RNAlater Stabilization Reagent 中に保存しておいた肝臓組織細片より、自動核酸抽出システム Quick Gene-800 (Fuji film) を用いて抽出した。RNA 濃度および純度 ($A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2.0$) は、NanoDrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc. DE, USA) を用いて測定した。

Real-time RT-PCR 法による CYP 分子種の mRNA 発現量は、SYBR Green ベースのインターカレーション法による One-Step SYBR RT-PCR kit (Takara Bio) を使用

し、Mx3000P リアルタイム PCR システムを用いて測定した。

Real-time RT-PCR に用いたプライマーは、GenBank より得た対象遺伝子の DNA 塩基配列をもとにタカラバイオの Perfect Real-Time Primer 検索 (<http://www.takara-bio.co.jp/realttime/search.php>) を用いて得た同社推奨の配列とし、同社に合成を依頼した。

Real-time RT-PCR による mRNA の発現量の解析では、増幅が指数関数的に起こる領域で、増幅産物が一定量に達するサイクル数 (threshold cycle ; Ct 値) を用いて算出し、ハウスキーピング遺伝子として Ppia (peptidylprolyl isomerase A) 遺伝子を採用し、Ppia mRNA に対する標的遺伝子の mRNA の量比を算出し、定量的に解析した。

(8) 統計解析

統計解析にはソフトウェア SPSS Ver. 17.0 (SPSS Inc., Japan) を用いた。各群間における平均値の差の検定については、一元配置分散分析のうち Dunnett の下位検定を実施し、 $p<0.05$ の場合に有意差ありとした。

(9) 動物実験委員会の承認

本動物実験は、十文字学園女子大学・同短期大学部全学委員会通則規定に定める動物実験委員会による承認を得た上で、関連指針・規定等を遵守して実施した。

C. 研究結果

(1) 実験 1

1) 体重および臓器重量への影響
バターバー抽出物製品 (BB) を、ヒトの一日摂取目安量 10 倍量 (BB (10)) および 100 倍量 (BBA (100)) で、ラットの胃内に 8 日間反復投与した場合、いずれの BB 投与群においても、体重増加には、対象群との間に有意差は認められなかった。一方、肝臓実重量 (g) および肝臓相対重量 (g/体重 100 g 比) については、BB (10) 群では対照群との間に有意差は認められ

なかったが、BB (100) 群では、対照群に比べて、実重量および相対重量のいずれについても、約 1.2 倍と有意な高値を示した。

腎臓、副腎、心臓の実重量、相対重量については、有意な群間差は認められなかった。

なお、剖検時の肉眼的観察では、BB (10) 群および BB (100) 群のいずれにおいても腎臓の色調の淡色化が認められた。

2) 肝臓および腎臓の病理組織学的検査所見への影響

CYP タンパク質の強い発現誘導にともなって観察され、肝細胞の適応変化といわれている小葉中心性肝細胞肥大はいずれの群においても認められなかった。

腎臓については、BB をヒト一日摂取目安量の 10 倍および 100 倍量で 8 日間反復投与したラットでは、尿細管上皮内の硝子滴沈着がほぼ全例で中等度に認められたが、対象群には見られなかった (図 1)。

3) 肝臓ミクロソーム画分の薬物代謝酵素 CYP 分子種への影響

a) CYP 分子種の酵素活性への影響

BB (100) 群の肝臓のミクロソーム画分では、対象群と比較して、MROD、PROD、BROD、DBFDB の活性が有意に増加した (図 2)。また、EROD 活性には対照群と BB (100) 群との間に有意な差は認められなかった。なお、BB (10) 群では、EROD、MROD、PROD、BROD、DBFDB 活性のいずれについても、対象群との間に有意差は認められなかった。

b) CYP 分子種のタンパク質発現への影響：Western Blot 法による検討

CYP1A1 は、いずれの群においても検出限界以下であった。

一方、CYP2B1/2 および CYP3A1 のタンパク質レベルでの発現については、対照群に比べて、BB (100) 投与群では著しく亢進していた。しかし、BB (10) 投与群では、CYP2B1/2、CYP3A1、CYP3A2 のタンパク質レベルでの発現に、対照群との差は認められなかった。

c) CYP 分子種の mRNA 発現への影響

CYP1A1、CYP1B1、CYP3A2、CYP2E1 の発現には、対象群と BB 投与群との間に有意差は見られなかった。また、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1 の mRNA レベルでの発現についても、対照群と BB (10) 群との間には有意差が認められなかった。しかし、BB (100) 群では、対象群と比較して、これら 4 つの CYP 分子種の mRNA レベルでの発現に有意差が認められた (図 3)。

(2) 実験 2

バターバー製品 A について実施した実験 1 と同様に、バターバー製品 B をヒト一日摂取目安量の 100 倍量で 8 日間反復投与したラットでは、対照群に比べて、肝臓実重量および相対重量のいずれも、有意な増大を示した。また、腎臓尿細管上皮内の硝子滴沈着が全例で認められた。CYP 分子種については、CYP 2B および CYP3A の発現が両製品の投与で亢進する結果が得られた。

(3) 実験 3

バターバー製品 A をヒト一日摂取目安量の 100 倍量で雌 SD 系ラットに 8 日間反復投与した場合、肝臓については実験 1 および 2 と同様の結果が得られた。しかし、雄ラットの腎臓で生じた尿細管上皮内の硝子滴沈着は認められなかった。

D. 考察

本報告では、ハーブサプリメントのリスク評価手法の確立に資するため、食品添加物のリスク評価の手法を参考に、バターバーを対象として、ラットを用いて安全性試験を実施した。バターバーは、システマティックレビューで片頭痛への有効性が検証されている一方、肝障害との因果関係があるとされている。しかしながら、安全性試験の報告はほとんど見られない。

特に、本研究では、肝臓における CYP の発現誘導を評価指標とした。バターバ

一抽出物をはじめ、ハーブ素材の多くは脂溶性生体異物を主要成分とする多成分系である。このような観点から、我々は、脂溶性生体異物の有害作用の標的となりやすい肝臓への影響、とくにその影響を鋭敏に反映すると考えられる CYP の発現誘導を主な評価指標として数種のハーブ素材について検討してきた。今回の研究は、その一環として位置づけられる。

生体異物は脂溶性物質に区分されるものであっても、その多くはキロミクロンには取り込まれにくく、門脈経由で肝臓に至ると推定される。

さらに、脂溶性が高く、キロミクロンに取り込まれてリンパ経由で血液循環に入った生体異物であっても、リポタンパク質リパーゼの作用でトリアシルグリセロールが放出された後に、キロミクロンレムナント中に残存するものが少なくないと推定される。これらの生体異物は、アポ E 受容体を介してキロミクロンレムナントがエンドサイトーシスを受けるのにもない、肝細胞に取り込まれると考えられる。この機序で肝臓に蓄積される脂溶性物質としては、ビタミン E が知られている。

このように、脂溶性生体異物の多くは、機序に違いはあるものの、肝臓に取り込まれて薬物代謝酵素等によって処理されると考えられ、この過程で、肝臓に取り込まれた物質それ自体が、あるいはその物質と薬物代謝系との相互作用が有害作用を発現する可能性がある。実際、ハーブ抽出物を利用した健康食品の摂取に伴う健康被害の症状としては、消化器症状とともに肝機能障害 1 の報告が多く、また海外の報告においても肝臓への作用、あるいは肝臓を介した作用として現れることが少なくなく、肝臓移植が必要な例や、死亡を含む重篤な例も発生している。

これらの背景のもとに実施した本研究では、バターバー抽出物製品をヒトの一日摂取目安量の 100 倍量で 8 日間反復投与したラット (BB (100) 群) において、体重の変化は来たさなかったが、肝臓の実重量および体重当たりの相対重量が対

照群に比べて約 20% 増大していた。また、BB (100) 群では、ミクロソーム画分の MROD、PROD、BROD、DBFDB 活性が有意に増大していた。EROD 活性への BB 投与の有意な影響は認められなかった。

EROD 活性は CYP1A1 活性、MROD 活性は CYP1A2 活性、PROD 活性は CYP2B 活性、DBFDB 活性は CYP3A 活性をそれぞれ反映し、また BROD 活性は、CYP2B 活性および CYP3A 活性両者の特性があるとされている。したがって、今回用いたバターバー抽出物製品は、CYP1A1 に対する誘導作用は示さないものの、CYP1A2、CYP2B および CYP3A を誘導する可能性が示唆された。そこで Western blot 法で検討した結果、BB (100) 群のミクロソーム画分では、タンパク質量レベルからみて、CYP2B1/2 および CYP3A1 の誘導が増大しており、酵素活性のデータと概ね一致した。

さらに、real-time RT-PCR を用いて mRNA レベルでの CYP 分子種の遺伝子発現への BB 製品投与の影響を解析したところ、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1 の mRNA レベルでの発現は、対照群と比較して有意に亢進していた。特に、CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1 については、対照群の 5 倍以上の強い発現亢進が認められた。

これらの結果をまとめると、今回用いた BB 製品は、ヒトの一日摂取目安量の 100 倍量でラットに投与すると、肝臓において CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1 の遺伝子発現を強く亢進させるとともに、肝臓重量の増大すなわち肥大を引き起こすことが明らかとなった。

一方、腎臓については、BB (10) 群および BB (100) 群において、対象群には見られなかった尿細管上皮内の硝子滴沈着が、ほぼ全例で中等度に認められた。

尿細管上皮内に沈着した硝子滴の分子実体については、免役組織化学等の手法を用いて精査することで同定可能と推定されるが、現時点では $\alpha 2\mu$ -グロブリンの蓄積によるものと考えている。

$\alpha 2\mu$ -グロブリン (分子量約 19,000) は、成熟雄ラット肝臓で産生・血中に分泌され、腎糸球体でろ過されて原尿中に

出現するが、その約半量は再吸収された後、尿細管上皮細胞内で加水分解される。その際、限定分解で生じた分子量約 16,000 の分子種に脂溶性の高親和性が結合していると、さらに分解されるのが妨げられ、この分子種が細胞内に蓄積し、硝子滴沈着を生じる。この硝子滴沈着の遷延化は、腎臓がんにつながる可能性が指摘されているが、 $\alpha_2\mu$ -グロブリンはラットそれも雄のみに特有なタンパク質なので、ヒトにおける化学物質の安全性確保においては、ラットに対する尿細管上皮内の硝子滴沈着誘発作用を特に留意する必要性は低いとされている。

これまで述べてきたように、本研究ではインターネット通信販売で購入した特定の BB 抽出物製品をヒトの一日摂取目安量の 100 倍量で 8 日間反復投与した結果、ヒトへの外挿の観点からは、体重、肝臓および腎臓の病理組織検査所見に関しては特に注目すべき変化は認められなかった。しかし、ヒトの一日摂取目安量の 100 倍量の BB 製品の投与は、肝臓における CYP2B1、CYP2B2、CYP3A1 の遺伝子発現を強く亢進させるとともに、肝臓肥大を引き起こすことが明瞭であった。

また、本研究において BB (100) 群で明瞭な発現誘導の亢進が認められた CYP 分子種は、CYP2B1/2 および CYP3A1 であった。基質特異性またタンパク質構造の面からラットの CYP 分子種に対応するヒトの CYP 分子種のうち主要なものは、それぞれ、CYP2B1/2 は CYP2B6、CYP3A1 は CYP3A4/5 とされる。

ラットの CYP1B1/2 に相当するヒトの CYP2B6 は、フェノバルビタール (抗てんかん薬) やリファンピシン (抗生物質) によって発現が強く誘導される。また、CYP2B6 は、医薬品のほぼ 25% の代謝に関わり、シクロホスファミドやタモキシフェン (抗がん薬)、ケタミン (麻酔薬)、プロポフォール (鎮静・全身麻酔薬) 等の体内動態に深く関わっている。

ヒトの CYP3A サブファミリーは、肝臓における含有量はチトクロム P450 の全量の約 30% とされるが、50% 以上の治療薬

の代謝に関わっており、最も重要な薬物代謝酵素とされている。中でも、CYP3A4 は肝臓での含有量が最も多い CYP3A 分子種である。CYP3A により代謝される医薬品には、テルフェナジン (抗アレルギー薬)、ミダゾラムやトリアゾラム (ベンゾジアゼピン系麻酔導入薬・鎮静薬)、キニジン (抗不整脈薬)、リドカイン (局所麻酔薬・抗不整脈薬)、カルマゼピン (抗てんかん薬・向精神薬)、ニフェジピン (血管拡張薬)、タクロリムス (免疫抑制薬・関節リウマチ治療薬)、ダブソン (ハンセン病治療薬)、エリスロマイシン (マクロライド系抗生物質)、デキストロメトルファン (非麻薬性鎮咳薬) 等のほか多数が知られている。さらに、CYP3A は、ステロイド、胆汁酸、レチノイン酸等の酸化代謝にも関わっている。CYP3A タンパク質は薬物への曝露によって、転写活性化の機序で発現が強く誘導され、特にリファンピシンはその作用が強いとされる。

このように、CYP2B や CYP3A は多くの医薬品の代謝の関わっていることから、ハーブサプリメントの摂取にともなうこれら分子種の発現誘導は、ハーブの主要な有害作用である医薬品との相互作用を引き起こす可能性がある。そうした例の 1 つとしてセイヨウオトギリソウ (St. John's Wort、*Hypericum perforatum*) の場合がよく知られている。セイヨウオトギリソウは、その地上部の有機溶媒による規格抽出物が、抑うつ症状に対して有効であることが多数のランダム化比較試験で検証されている。しかし、免疫抑制薬シクロスポリン、抗 HIV 薬サキナビル、強心薬ジゴキシンといった患者の生命維持に重要な医薬品のバイオアベイラビリティを低下させることが明らかになった。これを受け、セイヨウオトギリソウとの相互作用について、医薬品添付文書にその旨の記載が義務付けられ、またその他の行政措置による適切な対応がなされている。セイヨウオトギリソウと医薬品の相互作用のメカニズムとしては、セイヨウオトギリソウによる CYP3A4 の誘導が重要であると考えられている。

なし

E. 結論

本研究では、食品添加物のリスク評価法を参考に、ヒトの一日摂取目安量の100倍量のBB製品のラットへの投与は、肝臓におけるCYP2B1、CYP2B2、CYP3A1の遺伝子発現を強く亢進させるとともに、肝臓肥大を引き起こすことを明らかにした。NOAELからADIを算定する際の不確実係数を考慮すると、ラットで認められたようなBBの影響がヒトでも生じる可能性を否定することはできず、医薬品との相互作用への懸念も生じる。このような医薬品との相互作用が、BB摂取にともなう肝障害発生の機序の一端をなしていることも想定できる。BB投与ラットに生じた腎臓尿細管上皮内の硝子滴沈着は、人への外挿の際には問題にならない雄ラットに特有な $\alpha 2\mu$ -グロブリンによるものと推定された。

以上より、食品添加物のリスク評価法を参考に、CYPの発現誘導を主な評価指標として取り組んだ本研究の知見は、ハーブサプリメントのリスク評価手法の確立に資するものと考えられる。

2. 実用新案登録
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 鈴木真知、清家小百合、次山直美、Bu i Thi Ngoc Ha、端田寛子、佐々木菜穂、山崎優子、志村二三夫. ラット肝臓への影響に基づくハーブ素材butterburの安全性評価：第67回日本栄養・食糧学会大会、平成26年5月26日
- 2) 倉若美咲樹、岩田夏弥、次山直美、端田寛子、有田安那、佐々木菜穂、山崎優子、志村二三夫. ハーブ素材カバが有する環境化学物質用作用：第67回日本栄養・食糧学会大会、平成26年5月26日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

(HE染色)

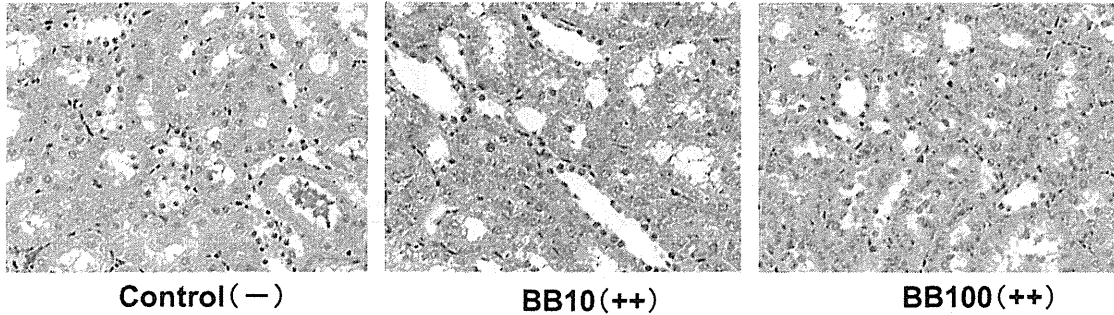
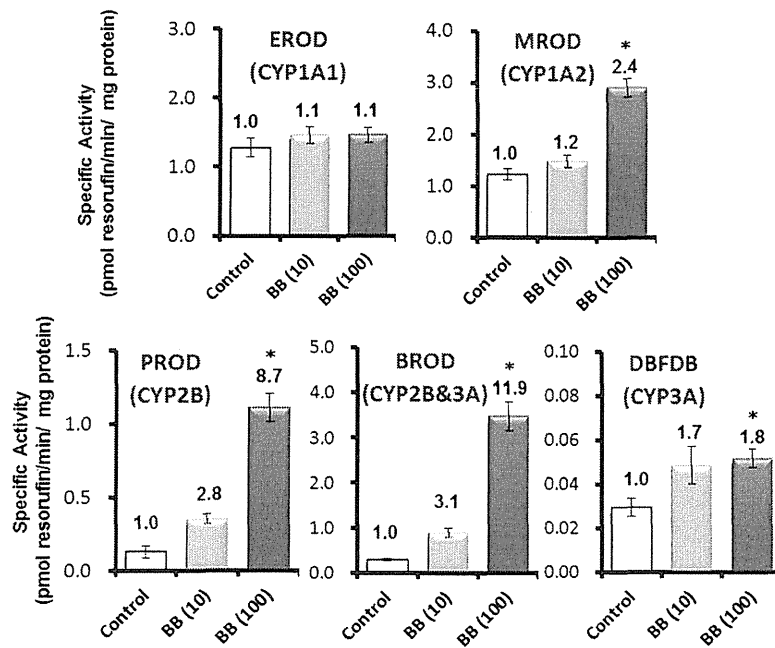
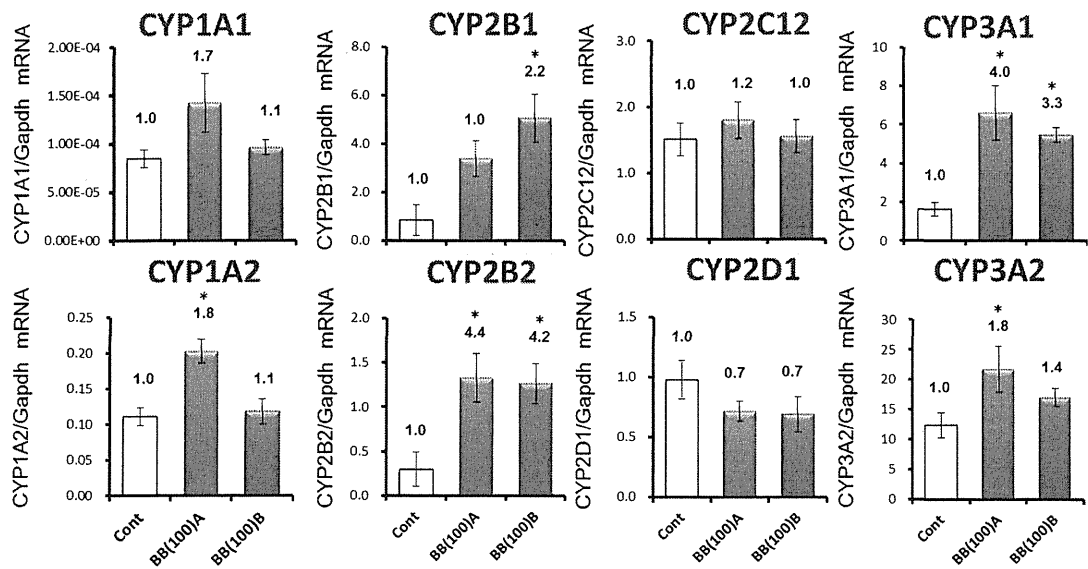


図1 バターバー投与ラットの腎臓病理組織学的所見



平均値±標準誤差(n=6) . BB : Butterbur. エラーバー上の数値は、対照群に対する倍数.
* . 一元配置分散分析の後にDunnettの多重比較 ($p < 0.05$) .

図2 バターバー投与ラット肝臓ミクロソーム画分の CYP 酵素活性



平均値±標準誤差 (n=6) . Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. BB : Butterbur.
 エラーバー上の数値は、対照群に対する倍数。*、一元配置分散分析の後にDunnettの多重比較 ($p < 0.05$) .

図3 バターバー投与ラット肝臓におけるCYP分子種のmRNA発現

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

製品の品質と原材料の安全性に関する研究
～市販セレン含有健康食品の化学種別分析について～

研究分担者 石見 佳子 （独） 国立健康・栄養研究所食品保健機能研究部
研究協力者 松本 輝樹 （独） 国立健康・栄養研究所食品保健機能研究部
市田 尚子 （独） 国立健康・栄養研究所食品保健機能研究部

研究要旨

食品に起因する健康被害との因果関係の解析において、製品中の原材料に関する安全性の検証は重要である。本研究では、安全性評価の一環として、天然・自然を標榜した原材料のなかでも、食品添加物に代替されているミネラル酵母に着目した実験的検討を行う。

本年度も、昨年度に引き続きセレンに着目し、形態（無機セレン及びセレン含有アミノ酸等）を明らかにするための分画方法について調査・研究を行うとともに、市販サプリメントを対象とした分画と化学種別含有量の評価を行った。

その結果、昨年度の検討で一部の市販サプリメントに無機セレンの存在が示唆されていたが、分画操作を行うことにより、有機セレンとして存在していることが示唆された。

A. 研究目的

研究代表者によるこれまでの検討から、健康食品による健康被害発生には、天然・自然を標榜した製品の品質の問題、ハイリスクグループによる安易な利用が関係していることが示唆されている。また、健康被害との因果関係の解析において、製品中の原材料の安全性の検証が必要である。

そこで本研究では、安全性評価の一環として、天然・自然を標榜した原材料に着目した実験的検討を行うこととした。昨年度、酵母を高濃度のミネラル溶液中で培養することによってタンパク質や核酸に結合させた「ミネラル酵母」を使用した製品における、セレンの実態調査を行った。その結果、一部の製品において、酵母以外の形態でセレンが存在する事が示唆されたため、本年度は存在形態を明らかとするための化学種別分析

(speciation analysis) について、無機セレンと有機セレンが分別できるよう検

討を行った。

B. 研究方法

(1) 文献調査によるミネラル酵母の化学種別分析方法の確認

ミネラル酵母の評価を行うにあたり、これまでの検討報告に関する学術論文調査を行った。検索語として、「speciation analysis」、「yeast」を検索条件とし、インターネット上の検索エンジンから検索を行った。

(2) 無機セレンと有機セレンの分画に関する検討

無機セレンとしてセレン標準溶液（亜セレン酸として存在、関東化学）を希釈した1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ セレン水溶液を、有機セレンとしてセレノメチオニン（和光純薬）を5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した水溶液（2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Se 相当水溶液）を、それぞれ用いた。検討は、2 回以上行い、樹脂を用いた検討では、溶出液に直接内標準 (In:

20 ng/ mL) を添加し ICP-MS にてセレンを測定、定量化した。

a. HPLC による分画方法

サイズ排除型カラム (Superdex Peptide HR 10/300 GL、GE Healthcare Life Sciences) を用い、UV= 220 nm、流速 1 mL/ min の測定条件下定性を行った。分画方法の詳細は、Fig. 1a に記す。

b. キレート樹脂を用いた分画方法

ホウ素・ヒ素・ゲルマニウム・セレンなどの半金属に対して高い選択性を持つキレート樹脂 (Diaion CRB03、三菱化学) を用いた。試料溶液に直接樹脂を 20 mL 投入し、60 r/ min で 45 min 振とうした。分画方法の詳細は、Fig. 1b に記す。

c. イオン交換樹脂を用いた分画方法

強酸性陽イオン交換樹脂 (Amberlite 200CT Na、オルガノ) を用いた。樹脂 20 mL をガラスカラムに充填し (σ 20 × 300 mm)、試料負荷後、純水を流速 1 drop/ sec で通液し、溶出液 50 mL を回収した。分画方法の詳細は、Fig. 1c に記す。

(3) 市販サプリメントを対象としたセレンの含有形態に関する検討

・使用機器

誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 装置: NexION 300D (パーキンエルマー株式会社)

・使用試薬

硝酸: 金属濃度 0.1 ng/ mL 以下の超高純度試薬 (関東化学株式会社、Ultrapur-100 超高純度試薬)

過酸化水素: 特級

セレン標準溶液: 市販の原子吸光分析用標準溶液を 3 % 硝酸水溶液を用いて希釈したものを使用した。

インジウム標準溶液: 市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、1 μ g/ mL の濃度の標準溶液を調製し、ポリプロピレン瓶にて室温で保存した。

・使用検体

前年度、塩酸抽出時高濃度の水溶性セ

レンの存在が確認された認証標準物質 SRM 3280 及び市販サプリメント 2 種 (C 及び D) について検討を行った。

試料 1 g を遠沈管に精密に量り、純水 10 mL を加え、10 分間振とう抽出を行った。抽出混合物は、3000 rpm、5 分間で遠心分離後上澄み液を回収し、この操作を 3 回行った。上澄み液は、50 mL に定容後、0.45 μ m ろ過フィルターにて不溶物をろ過し、試験溶液 5 mL をイオン交換樹脂カラムに負荷した。

水溶出液に含まれる Se は、湿式灰化後、ICP-MS による評価を行った。

詳細は、以下の通りである。

a. 湿式灰化

溶出液はコニカルビーカーに回収し、蒸発乾固させたのち、硝酸 5 mL を加え、時計皿で蓋をし、穏やかに加熱した。激しい反応が終了した後、適宜過酸化水素 1 mL を加え、再び加熱した。内容液が褐色～黒色となったらただちに硝酸 2 mL を加え、内容液が無色～淡黄色となったことを確認し、白煙を生じるまで加熱を続けた。蒸発乾固させ放冷後、炭化物がなくなるまで分解操作を繰り返し行い、残留物を 3% 硝酸水溶液でよく洗い込み、不溶物をろ過した後、50 mL に定容し、試験溶液とした。

最終溶液 50 mL 中には、ICP-MS 測定時の内部標準物質として 1 μ g/ mL の In 標準溶液を 1 mL 添加した。

b. ICP-MS による定量化

Se 測定用標準溶液 (10、20、50、100、200、500 及び 1000 ng/ mL) について、内部標準物質 (In: 20 ng/ mL) とのイオンカウント比を ICP-MS から求め、標準溶液の濃度により検量線を作成した。同様に、試料溶液は、あらかじめ作成した検量線から試料溶液中の Se 濃度を求めた。このとき、濃度の高い試験溶液については、適当な濃度に希釈した後測定に用いた。

ICP-MS 装置の測定条件は、以下の通りである。

試料導入速度: 0.4 mL/ min